

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 285 964 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
26.02.2003 Patentblatt 2003/09

(51) Int Cl.7: **C12N 15/09**, C07K 14/47,
C07K 16/18, C12Q 1/68,
C12N 15/11, G01N 33/50

(21) Anmeldenummer: **02090246.6**

(22) Anmeldetag: **12.07.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **10.08.2001 DE 10139874**

(71) Anmelder: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**
13353 Berlin (DE)

(72) Erfinder:

- **Weiss, Bertram**
14163 Berlin (DE)
- **Lessl, Monika**
16548 Gienicke-Nordbahn (DE)
- **Peters-Kottig, Michael**
10437 Berlin (DE)
- **Beckmann, Georg**
10439 Berlin (DE)

(54) **Humane Mater Proteine**

(57) Es werden zwei humane MATER-Proteine sowie deren Verwendung für Fertilitätsstörungen, Therapie und Diagnose beschrieben.

EP 1 285 964 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Mater und dessen Verwendung als Arzneimittel für die Beeinflussung von apoptotischen Prozessen, die eine grundlegende Rolle spielen bei der Fertilitätskontrolle.

[0002] Zur Kontrolle der Fertilität ist die "klassische Pille" als weibliches Kontrazeptivum, das am häufigste eingesetzte Mittel der Wahl. Ihre regelmäßige Einnahme führt zur Ovulationshemmung bei der Frau. Das Prinzip dieser Methode ist, dass es durch die Einnahme der Pille zu einer Unterdrückung der endogenen Steroidhormonproduktion im Ovar und somit zu einer Ovulationshemmung kommt. Ein Nachteil ist, dass ein natürlicher Zyklus somit bei der Frau nicht mehr vorhanden ist. Zudem können in Zusammenhang mit der Einnahme der Pille bei Patientinnen mit Risikopotential Nebenwirkungen wie beispielsweise Brustspannungen, Gewichtszunahmen etc. auftreten.

[0003] Durch zahlreiche Untersuchungen ist belegt, dass bei der Frau mit zunehmendem Alter die Fertilität abnimmt. Dies ist unter anderem auf eine schlechtere Qualität der Eizelle, eine erhöhte Abortrate, verstärkte Exposition mit Infektionskeimen (z.B. Chlamydien oder Gonokokken) zurückzuführen. Da sich in den Industrieländern jedoch das Alter der Erstgebährenden immer weiter nach hinten verschiebt, ist es notwendig, Möglichkeiten zur Verbesserung der Fertilität zu finden. Dieses trifft für die Frau und auch für den Mann zu. Für Paare mit Fertilitätsstörungen stehen heute die Techniken der assistierten Reproduktion zur Verfügung (*in vitro* Fertilisation (IVF); Gamete intrafallopian transfer (GIFT), Intrauterine Insemination). Diese Methoden sind jedoch invasiv und in den meisten Fällen mit einer vorherigen Stimulation der Follikelreifung bei der Frau durch Proteohormone (Follikel-stimulierendes Hormon/FSH) verbunden. Diese kann zu unangenehmen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen oder Schmerzen im Abdomen, im schlimmsten Fall jedoch auch zum sogenannten ovariellen Hyperstimulationssyndrom führen.

[0004] Es besteht die dringende Notwendigkeit neue Substanzen und Mittel zur Fertilitätskontrolle, das heißt sowohl zur Fertilitätsförderung als auch zur Fertilitätshemmung, bereitzustellen.

[0005] Bei Mäusen wurde gezeigt, dass weibliche Tiere ohne ein OP (Ooplasm-specific protein) -1 Gen infertil sind (Tong und Nelson, 1999, Endocrinology 140, 3720 - 3726 und Tong *et al.*, Nature Genetics, 2000, 26, 267 - 267), während die Fertilität der männlichen Tiere unverändert bleibt. Es konnte gezeigt werden, dass die Infertilität durch eine Blockade der Entwicklung der befruchteten Eizelle nach dem Zwei-Zell-Stadium zustande kommt. Der Zyklus der Mäuse ist normal, Tiere ovulieren spontan nach Stimulation mit Gonadotropin. Befruchtete Zellen dieser transgenen Tiere jedoch verbleiben im Zwei-Zell-Stadium ohne weitere Entwicklung bzw. degenerieren ca 3 Tage nach Fertilisation. Das OP-1 wird auch als MATER (maternal-antigen-that-embryos-require) bezeichnet.

[0006] In einem Maus-Modell der Autoimmun-Oophoritis konnten Antikörper gegen Maus-MATER-Protein nachgewiesen werden. Dieses Modell hat viele Gemeinsamkeiten mit dem humanen Krankheitsbild des autoimmune-premature ovarian-failure, so dass die Möglichkeit besteht, dass ein putatives humanes MATER-Protein eine ähnlich bedeutende Rolle spielt bei der Regulation der Fertilität wie das Maus-MATER. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob ein humanes Homolog zum Maus-MATER Protein existiert.

[0007] In der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, dass humanes MATER stark in der Gebärmutter (Uterus) exprimiert wird. Dabei zeigt die Expression in der inneren Schicht des Uterus, dem Endometrium, eine deutliche Regulation in Abhängigkeit vom Zyklus der Frau. Die Expression von Mater ist im sogenannten Implantationsfenster des Zyklus (ca. 8 Tage nach dem Anstieg des luteinisierenden Hormons LH, das die Ovulation auslöst) deutlich erniedrigt im Vergleich zur Phase direkt nach der Ovulation (siehe Figur 4). Mittels quantitativer Bestimmungen wurde die mRNA aus dem humanen Endometrium dreier verschiedener klinischer Studiengruppen miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Studien ergab, dass die mRNA von MATER im Vergleich zur Kontrollgruppe (vor Öffnung des Implantationsfensters) in der Gruppe LH +8 (Zeit des offenen Implantationsfensters) bei gesunden Frauen stark erniedrigt ist. In der Gruppe LH +8/EMT (Endometriose-Patientinnen) konnten in 2 von 3 Patientinnen erhöhte Menge an MATER-mRNA festgestellt werden. Eine Ursache der Infertilität, wie sie bei Endometriose-Patientinnen beobachtet wird, kann auf der erhöhten MATER-Expression beruhen, da im Implantationsfenster, also zum Zeitpunkt der fertilen Phase, die MATER-Expression im Endometrium von fertilen Frauen erniedrigt ist.

[0008] Ein humanes MATER-Protein stellt daher eine geeignete Zielsubstanz dar, um neue Mittel zur Fertilitätskontrolle zu identifizieren.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt eine Nukleinsäure bereit umfassend

- a. die in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 dargestellte Nukleotidsequenz,
- b. eine einer Sequenz aus a. im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
- c. eine mit den Sequenzen aus a. oder b. unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz mit der Funktion eines humanen MATER-Proteins.

[0010] Der Begriff "Hybridisierung unter stringenten Bedingungen" gemäß der vorliegenden Erfindung wird bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) definiert. Eine

stringente Hybridisierung liegt beispielsweise vor, wenn nach dem Waschen für 1 h mit 1 x SSC und 0,1%SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1h in 0,2 x SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein Hybridisierungssignal beobachtet wird. Die Nukleinsäuren, die unter diesen Bedingungen mit der in Seq ID NO 1 und/

oder 3 gezeigten Nukleinsäure oder einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz hybridisiert, sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0011] Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige DNA, z.B. cDNA, oder RNA, z.B. mRNA, cRNA, pre-mRNA darstellen.

[0012] Die in Seq ID NO1 und Seq ID NO 3 dargestellten Nukleinsäuren kodieren für ein humanes MATER Protein. Sie stellen Splice-Varianten desselben Gens dar. Bei der in Seq ID NO 3 dargestellten Sequenz fehlt das Exon 4.

[0013] Bevorzugt ist die Nukleinsäure, die einen Protein kodierenden Abschnitt der in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz umfaßt. Ein Protein kodierender Abschnitt der in Seq ID NO 1 dargestellten Sequenz liegt im Bereich von Nukleotid 1 bis 3489 und der in Seq ID NO3 dargestellten Sequenz im Bereich von Nukleotid 1 bis 3432.

[0014] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit der in Seq ID NO 2 oder Seq ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenz kodiert.

[0015] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure ist aus Säugern, z.B. humanen Zellen oder aus einer cDNA-Bibliothek oder einer genomischen Bibliothek, die z.B. aus menschlichen Zellen gewonnen wird, erhältlich. Sie kann nach bekannten Techniken unter Verwendung kurzer Abschnitte der in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 gezeigten Nukleinsäuresequenz als Hybridisierungssonden oder Amplifikationsprimer isoliert werden.

[0016] Die Erfindung betrifft weiterhin Polypeptide, die von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert werden. Diese Polypeptide haben die Funktion eines humanen MATER Proteins. Die Funktion des MATER-Proteins ist die einer NTPase, die in Zusammenhang steht mit der Apoptose. Durch Fehlfunktionen im MATER-Protein kommt es zu einem Arrest der Entwicklung der sich im Zwei-Zell-Stadium befindenden befruchteten Eizelle. Die Zellen unterlaufen Apoptose, eine weitere Entwicklung ist nicht mehr möglich.

[0017] Weiterhin Gegenstand der Erfindung ist ein Polypeptid, das die in Seq ID NO 2 oder Seq ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ein rekombinantes Polypeptid, ein natürliches, isoliertes Polypeptid oder ein synthetisches Polypeptid sein.

Das erfindungsgemäße Polypeptid enthält verschiedene Domänen: eine Dapin-(Domain in apoptosis and interferon response), eine NACHT (NAIP, CIA, HET- and TP-1) und eine DUF(Domain of unknown function) - Domäne. Diese Domänen werden in Zusammenhang mit Apoptose gebracht (Staub E. *et al.*, TIBS, 2001, 26 (2), 83 - 85, Koonin EV, Aravind L., TIBS, 2000, 25 (5), 223 - 224). Es gibt Hinweise darauf, dass Mitglieder der NACHT-Familie NTPasen beinhalten, die anti-apoptotische Wirkung haben. Die Dapin-Domänen, die verantwortlich sind für die Ausbildung von Homo-oder Hetero-Dimeren, wurden bisher bei Proteinen beschrieben, die in Apoptose oder inflammatorische Prozesse involviert sind. MATER wirkt antiapoptotisch, beim Fehlen bzw. bei Fehlfunktionen des MATER-Proteins gehen die Zellen in die Apoptose, eine weitere Entwicklung des Zwei-Zell-Stadiums ist nicht mehr möglich. Außerdem enthält MATER 14 sogenannte "Leucin-rich-repeats" (LRR, Kajava AV, 1998, J. Mol. Biol. 227, 519 - 527), die für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Obwohl die Homologie zwischen der humanen und Maus-Sequenz nur 52% beträgt, zeigen Maus-Mater -und humanes Mater-Polypeptid in den Bereichen aller Domänen hohe Sequenzhomologie, mit Ausnahme der Dapin-Domäne (siehe Abbildungen 1 und 2).

[0018] Die mRNA des erfindungsgemäßen Polypeptids nach Seq ID NO 2 oder Seq ID NO 4 wird vorwiegend in Ovarien, in Testes und in der Plazenta transkribiert.

[0019] Das erfindungsgemäße Polypeptid oder Teilbereiche davon (Peptide) können zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper können die Polypeptide oder Peptide z.B. an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gebunden werden und Tieren, z.B. Kaninchen, gespritzt werden. Sie können auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Zur Antikörperherstellung kann ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Peptid oder eine Mischung mehrerer erfindungsgemäßer Peptide verwendet werden. Die Herstellung der Antikörper erfolgt dabei nach Standardverfahren wie sie z.B. in Kohler, G. und Milstein, C., Nature 1975, 256, 495 - 497 und Nelson, P. N. *et al.*, Mol. Pathol. 2000, 53, 111 - 117 beschrieben sind.

[0020] Gegenstand der Erfindung sind auch die Antikörper, die gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Detektion der erfindungsgemäßen Polypeptide verwendet werden. Dies kann z.B. durch Immunhistochemie erfolgen. Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch in anderen Immuntests wie z.B. einem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) oder in Radioimmuntests eingesetzt werden. So kann die Konzentration an erfindungsgemäßen Polypeptid in Gewebe- oder Zellextrakten nachgewiesen werden.

[0021] Der Nachweis der Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids kann auch über den Nachweis von mRNA in den Zellen erfolgen. Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung einer Sonde mit Nukleinsäurese-

quenzen, die komplementär zu den Nukleinsäuresequenzen sind, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, zur Herstellung eines Reagenz zum Nachweis der Gegenwart von erfindungsgemäßer mRNA in Zellen. Eine Sonde ist ein kurzes DNA-Stück mit mindestens 14 Nukleotiden. Die erfindungsgemäßen Sonden können z.B. in einer Northern Blot Analyse verwendet werden. Diese Methode ist z.B. in Sambrook, J. *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben. Andere Methoden zum Nachweis der RNA sind *in situ* Hybridisierung, RNase Protection Assay oder PCR.

[0022] Die Erfindung betrifft außerdem Antisense-Moleküle, die gegen die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz gerichtet sind und die Expression des MATER-Proteins unterdrücken können. Derartige Moleküle können gezielt zur Kontrazeption eingesetzt werden.

[0023] Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Vektoren die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthalten. Vektoren können prokaryontische oder eukaryontische Vektoren sein. Beispiele für Vektoren sind pPRO (Clontech), pBAD (Invitrogen), pSG5 (Stratagene), pCI (Promega), pIRES (Clontech), pBAC (Clontech), pMET (Invitrogen), pBlueBac (Invitrogen). In diese Vektoren können mit den dem Fachmann bekannten Methoden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eingefügt werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren befinden sich vorzugsweise in Verbindung mit Expressionssignalen wie z.B. Promotor und Enhancer auf dem Vektor.

[0024] Die Erfindung betrifft ferner Zellen, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert sind. Als Zellen können z.B. *E. coli*, Hefe, *Pichia*, Sf9, COS, CV-1 oder BHK verwendet werden. Diese Zellen können für die Produktion des erfindungsgemäßen Polypeptids oder für Testsysteme verwendet werden.

[0025] In den USA leiden 1% der Frauen an 'autoimmune premature ovarian failure', eine Erkrankung deren klinisches Syndrom durch die Ausbildung von Amenorrhoe (<40 Jahre), durch Infertilität und durch Symptome der Menopause, verursacht durch Hypoestrogenämie und Hypergonadotropinämie, charakterisiert ist (Nelson and Tong, Endocrinology, 1999, 140, 3720 - 3726). In einem analogen Maus-Modell der Autoimmun-Oophoritis konnte gezeigt werden, dass eine der Ursachen für diese Erkrankung die Ausbildung von Antikörpern gegen das Maus-Mater-Protein ist. Ein Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide oder der dafür kodierenden Nukleinsäuren als Zielsubstanz zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von Fertilitätsstörungen, deren Ursache in einer Fehlfunktion des MATER-Proteins liegt.

Insbesondere erfasst die Erfindung die Verwendung

- a. einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure,
- b. eines erfindungsgemäßen Polypeptids, oder
- c. einer erfindungsgemäßen Zelle

zur Identifizierung von Effektoren eines erfindungsgemäßen Polypeptids. Effektoren sind Substanzen, die auf das erfindungsgemäße Polypeptid inhibitorisch oder aktivierend wirken, und die in der Lage sind, die MATER-Funktion der erfindungsgemäßen Polypeptide zu beeinflussen.

[0026] Für die gezielte Kontrazeption kann es von Vorteil sein, Embryos im Zwei-Zell-Stadium festzuhalten um eine weitere Entwicklung zu verhindern. Durch Gabe von Antikörpern, die gegen das erfindungsgemäße Polypeptid gerichtet sind, kann die endogene Funktion von MATER beeinträchtigt und / oder aufgehoben werden. Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung von Antikörpern die gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet sind.

[0027] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Testsystem zur Identifizierung von Effektoren eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei ein erfindungsgemäßes Polypeptid als ganzes oder Teilsequenzen davon mit einem Modulator inkubiert werden kann und beispielsweise die Interaktion von MATER mit Proteinen oder Teilsequenzen anderer Proteine gemessen werden kann (Protein-Interaktionsassay). Die Protein-Protein Interaktionen sollen in dem Mammalian Two-Hybrid Assay System (Stratagene) gemessen werden, in dem die Interaktion zwischen MATER und anderen Proteinen oder Teilsequenzen davon, über die Aktivierung der Expression eines Reporter Gens bestimmt wird.

[0028] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Testsystem zur Identifizierung von Effektoren eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei ein erfindungsgemäßes Polypeptid als ganzes oder Teilsequenzen davon mit einem Modulator inkubiert werden kann und beispielsweise die Menge an hydrolysiertem Nukleotid gemessen werden kann. Als Teilsequenz kann z.B. der Bereich, der die "Leucin-rich-repeats" und die NACHT-Domäne umfaßt, oder kürzere Stücke davon verwendet werden. Die Aktivität der Effektoren kann z.B. gemessen werden, indem markiertes NTP verwendet wird und die Spaltung in NDP und Pi gemessen wird. (NTPase-Assay).

[0029] Neben der Hydrolyse von NTP kann auch ein Bindungstest durchgeführt werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Bindung von NTP an MATER verhindern.

Dieser Bindungstest kann auch mit einer erfindungsgemäßen Zelle durchgeführt werden, die das erfindungsgemäße Polypeptid enthält. Neben der Bindung der zu testenden Substanzen an MATER kann auch ein intrazellulärer Effekt gemessen werden.

[0030] Die Effektoren des erfindungsgemäßen Polypeptids können zur Behandlung von Krankheiten, die auf Fehl-

funktionen im MATER-Protein beruhen, eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind ovarielle Dysfunktion, 'Autoimmune premature ovarian failure', entzündliche Erkrankungen und Erkrankungen des Immunsystems. Außerdem können diese Effektoren zur Behandlung von weiblicher Infertilität eingesetzt werden.

[0031] Die Effektoren des erfindungsgemäßen Polypeptids können auch zur Kontrazeption bei der Frau eingesetzt werden. Blockieren Sie die NTPase-Aktivität von Mater so unterläuft die befruchtete Eizelle Apoptose und eine weitere Entwicklung ist nicht mehr möglich.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Testsystem zur Identifizierung von Effektoren eines erfindungsgemäßen Polypeptids wobei ein erfindungsgemäßes Polypeptid als ganzes oder Teilsequenzen davon mit einem Modulator inkubiert werden kann und beispielsweise Apoptoseinduktion in Zellen gemessen werden kann. Als Teilsequenz kann z.B. der Bereich der die "Leucin-rich-repeats" und die NACHT-Domäne umfaßt, oder kürzere Stücke davon verwendet werden. Die Aktivität der Effektoren kann z.B. gemessen werden, indem ihr Einfluss auf die Apoptoseinduktion bei Zellen, die mit Mater oder einem Teilstück von Mater inkubiert wurden (Cell-Death Assay).

[0032] Es wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Polypeptid ein Antigen darstellt, das unbedingt erforderlich ist für die Entwicklung des Embryos über das Zwei-Zell-Stadium hinaus. Frauen, die unter Fertilitätsstörungen leiden könnte direkt das Antigen appliziert werden. Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz des Antigens *in vitro* zu einer Oocytenkultur. Eine weitere Möglichkeit wäre der Zugabe des Antigens in das Befruchtungsmedium oder in das Medium zur Kultur des Embryos. Die so präparierten Oocyten werden dann für die *in vitro* Fertilisation verwendet. Eine Behandlung mit Antikörpern gegen das erfindungsgemäße Polypeptid oder Teilstücken davon könnte von Frauen zur Fertilitätskontrolle genutzt werden.

[0033] Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung eines pharmazeutischen Mittels, wobei

- a. Substanzen mit einem erfindungsgemäßen Testsystem in Kontakt gebracht werden,
- b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird,
- c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zeigt, identifiziert wird
- d. und die in Schritt c. identifizierte Substanz mit in der Pharmazie üblichen Formulierungsstoffen gemischt wird

Unter Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids ist die NTPase Aktivität des Polypeptids zu verstehen oder dessen Eigenschaft Apoptose zu induzieren. Eine Substanz, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren identifiziert wird kann gegebenenfalls bezüglich metabolischer Stabilität, Aktivität in einem erfindungsgemäßen Testsystem und/oder Bioverfügbarkeit optimiert werden. Dafür können in der Chemie gängige Methoden verwendet werden.

Die bevorzugten Zubereitungen bestehen in einer Darreichungsform, die zur oralen, enteralen oder parenteralen Applikation geeignet ist. Solche Darreichungsformen sind beispielsweise Tabletten, Filmtabletten, Dragees, Pillen, Kapseln, Pulver oder Depotformen sowie Suppositorien. Entsprechende Tabletten können beispielsweise durch Mischen des Wirkstoffs mit bekannten Hilfsstoffen, beispielsweise inerten Verdünnungsmitteln wie Dextrose, Zucker, Sorbit, Mannit, Polyvinylpyrrolidon, Sprengmitteln wie Maisstärke oder Alginsäure, Bindemitteln wie Stärke oder Gelatine, Gleitmitteln wie Carboxypolymethylen, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetatphthalat oder Polyvinylacetat, erhalten werden. Die Tabletten können auch aus mehreren Schichten bestehen.

[0034] Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Bestimmung der Autoimmun-Antikörper gegen das MATER-Protein. Autoimmunität ist ein gut beschriebener Mechanismus für das 'Premature ovarian failure', einer Erkrankung bei der die Ovarien der Frauen von ihrem eigenen Immunsystem angegriffen werden, eine Entzündung der Ovarien ist meist das Resultat. Zur Diagnose von Fertilitätsstörungen können Körperproben (Gewebe oder Flüssigkeiten) bei der Frau untersucht werden. Der Gehalt an Autoimmun-Antikörpern läßt sich mittels Immuntests wie z.B. einem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) oder in Radioimmunotests bestimmen. So kann die Vorhandensein an Autoimmun-Antikörpern in Gewebe- oder Zellextrakten nachgewiesen werden und erlaubt Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand des Ovars.

[0035] Es wurde auch gefunden, dass die Eizellqualität abhängig ist von der Mater Expression. Daher kann die Mater Expression in Eizellen auch als diagnostischer Marker zur Bestimmung der Eizellqualität eingesetzt werden.

[0036] Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Diagnostik von Erkrankungen, deren Ursachen Mutationen des MATER Proteins beinhalten. Hierzu können DNA-Chips verwendet werden. Die Erfindung betrifft daher weiterhin einen DNA-Chip, auf dem mindestens ein Oligonukleotid immobilisiert ist, das der vollständigen cDNA-Sequenz oder einer Teilsequenz bzw. komplementären Sequenz zu der in Seq ID 1 beschriebenen, entspricht. Die Erfindung betrifft somit ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen DNA-Chips zur Diagnose von Fertilitätsstörungen u. a. im Ovar und Endometrium.

DNA-Chips, auch als DNA-Mikroarrays bekannt, sind miniaturisierte Träger, meist aus Glas oder Silizium, auf deren Oberfläche DNA-Moleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster in hoher Dichte immobilisiert werden. Die Oberflächen-gebundenen DNA-Moleküle werden mit komplementären, eventuell markierten Nukleinsäuren hybridisiert. Die Markierung kann ein Fluoreszenzfarbstoff sein.

Bei Oligonukleotid-Chips stellen die Oligonukleotide, die auf einem erfindungsgemäßen DNA-Chip gebunden sein können, Teilsequenzen der Genprodukte (mRNA bzw. daraus abgeleitete cDNA) dar. Es können ein oder mehrere Oligonukleotide pro Gen auf dem DNA-Chip gebunden sein. Bevorzugt sind 25 Nukleotid-lange Oligonukleotide. Diese werden bevorzugt aus dem jeweiligen 3'untranslatierten Ende des Gens ausgewählt. Methoden zur Herstellung und

Verwendung von DNA-Chips sind z.B. in den US-Patenten Nr. 5,578,832; 5,556,752 und 5,510,270 beschrieben. Bei cDNA-Chips sind die vollständigen Genprodukte (cDNAs) oder Subfragmente (200-500bp lang) auf dem Chip gebunden. Die Methode wird z. B. in Eckmann L *et al.*, J. Biol. Chem., 2000, 275(19), 14084-14094 beschrieben.

[0037] Zuerst werden die geeigneten DNA-Sequenzen gemäß Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3, bestimmt. Geeignet sind Sequenzen, die mit den ausgewählten Gentranskripten hybridisieren können. Die Oligonukleotide werden dann durch einen chemischen Prozess, der auf photolithographischen Verfahren basiert, auf dem Chip hergestellt. Dazu werden photolithographische Masken verwendet, die durch geeignete Computer-Algorithmen erzeugt wurden.

Die markierte RNA wird mit dem Chip in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Anschliessend wird der Chip in einem Scanner analysiert, der die Hybridisierungsprofile bestimmt. Dadurch kann festgestellt werden, ob Veränderungen des Transkripts erfolgt sind (z.B. Mutationen, Trunkierungen). Ebenso ermöglicht es die Quantifizierung des Transkripts und so des MATER-Proteins und ermöglicht Rückschlüsse auf z.B. eine Mutation im Promoter.

Es wurde gefunden, dass Mater während des Implantationsfensters (LH +8) vermindert exprimiert wird im Vergleich zur prärezeptiven Phase (LH +4). Durch Bestimmung der MATER-Expression kann demnach der optimale Zeitpunkt für die Implantation von Oocyten, die *in vitro* fertilisiert wurden, bestimmt werden. Zudem kann die Bestimmung der Mater Expression als diagnostischer Marker zur Bestimmung des Implantationsfensters im Endometrium eingesetzt werden.

Beschreibung der Abbildungen

[0038] Fig. 1 zeigt ein multiples Sequenzalignment der MATER-Proteine von Maus und Mensch.

[0039] Fig. 2 gibt die Lokalisation der verschiedenen Domänen innerhalb des humanen MATER-Proteins an. Die Spalten "from" und "to" beziehen sich auf die Aminosäurennummerierung gemäß Seq ID2.

[0040] Fig. 3a zeigt das Expressionsmuster der mRNA des humanen MATER-Proteins in verschiedenen Geweben nachgewiesen durch die PCR. Als interne Kontrolle wurden Primer für die Cyclooxygenase (COX) verwendet. Nach der PCR-Amplifizierung wurden die Produkte auf einem Agarose-Gel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

[0041] Fig. 3b zeigt die Genexpression der RNA von MATER in verschiedenen Geweben, nachgewiesen durch die real time quantitative PCR -Methode. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass MATER in der Placenta und dem Endometrium stark exprimiert wird. Im Ovar wird MATER nur schwach exprimiert. Es handelt sich hier um Ovarien von menopausalen Patientinnen. In diesen Ovarien sind nur noch sehr wenige Eizellen vorhanden und diese Eizellen sind zusätzlich von minderer Qualität, so dass eine geringe Expression von Mater vorliegt.

[0042] Fig. 4 zeigt die Genexpression der RNA von MATER im Endometrium nachgewiesen durch die real time quantitative PCR-Methode. Eine stark erniedrigte Regulation des humanen MATER-Gens in der Gruppe (LH+8) im Vergleich zur Gruppe LH+4 ist eindeutig. Spezifische "Primer" für das MATER wurden benutzt. Gruppe LH +4: vor der Öffnung des Implantationsfensters; Gruppe LH +8: Zeit der geöffneten Implantationsfensters bei gesunden Frauen; Gruppe LH +8 EMT: Zeit der geöffneten Implantationsfensters bei an Endometriose erkrankten Frauen; LH: luteinisierendes Hormon; 4 bzw. 8: Zeitraum in Tagen

Beispiele

[0043] Die in den Beispielen verwendeten molekularbiologischen Methoden wie z.B. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Herstellung von cDNA, Klonierung von DNA, Sequenzierung von DNA, wurden in bekannten Lehrbüchern wie zum Beispiel in Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, J. *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 1: Klonierung, Expression und Reinigung des humanen Mater-Proteins.

[0044] Für die Expression der beiden Splice-Varianten des Mater-Proteins wurde der kodierende Bereich mittels Polymerasekettenreaktion (Reaktionsbedingungen siehe Bsp2) amplifiziert (Primer für den N-terminalen Bereich: 5' ATGGAAGGAGACAAATCGCTC 3'; Primer für den C-terminalen Bereich 5' TAGTTGGCATTCTTTTGATG 3'), in den Baculovirusexpressionsvektor pBlueBac4.5/V5-His-TOPO (Invitrogen) bzw. den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen) eingefügt. Um Nachweis und Reinigung zu vereinfachen, erfolgte eine Fusion mit einem His-Tag. Nach Cotransfektion von Insektenzellen mit der Bac-N-Blue DNA wurden rekombinante Viren erzeugt, die durch eine PCR-Verfahren identifiziert wurden. Ein Phagenstock wurde dann angelegt und für weitere Transfektionen und Produktion des Mater in größeren Mengen verwendet. Die Reinigung der His-getaggtten Proteine erfolgte

über eine Nickel- Affinitätssäule.

Beispiel 2: Untersuchungen zur Expression der mRNA des humanen Mater-Proteins.

[0045]

a) Zur Untersuchung der Expression der mRNA wurde eine PCR wie folgt durchgeführt. Als Template wurde c-DNA von folgenden Geweben verwendet: Knochen, Samenleiter, Prostata, Hoden, Placenta, Brust, Ovar, Nebenniere, Haut, Niere und Lunge. Der Reaktionsansatz enthält: 2 µl cDNA; 20 µM Primer (antisense Primer: 5' cacatgaacatctctccc 3'; sense primer: 5'cacagtcctccagatcagc 3'), 10 mM d'NTP; 1,5 mM MgCl₂ und 0,5U Taq Gold (Perkin Elmer). Die PCR- Konditionen sind 94°C 10 min dann 40 Zyklen 94°C 1 min; 58°C 1 min; 72°C 1,5 min. Anschließend wurde ein Aliquot auf ein 1% Agarosegel in 1X TAE-Laufpuffer aufgetragen. Unter diesen Bedingungen konnte eine Expression der mRNA in folgenden Geweben gefunden werden: Testis, Placenta und Ovar (siehe Figur 3a).

b) Bestimmung der MATER-RNA Mengen in endometrialen Proben durch Real-time quantitative RT-PCR Analyse:

Endometrium wurde von Patientinnen, die den drei Gruppen LH+4, LH+8, LH+8/Endometriose gehören, entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus den durch "Mörsern" unter flüssigem Stickstoff pulverisierten Geweben wurde mittels TRIzol (Invitrogen) die Gesamt-RNA isoliert. Ausgehend von 5 µg Gesamt-RNA wurde zunächst ein DNase I-Verdau (Invitrogen) und anschließend eine Erststrang-Synthese unter Verwendung des SUPER-SCRIPT First-Strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. Für die Amplifizierung der Transkripte zur relativen Quantifizierung wurden 0,125 µl Erststrang-DNA eingesetzt. Unter Verwendung von human Mater spezifischen Primer Paaren (forward Primer: 5'CCT CCC AAG TTG AGG GAT CTT-3' und reverse Primer: 5'TAC CCC TGG TGT GCA GCA C-3') wurde die Amplifizierung unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt: 10 Min. 95 °C; 15 Sek. 95 °C, 1 Min. 60 °C (40 Zyklen). Als interne Kontrolle wurden Primer für human Cyclophilin (huCYC) Part Number 4310857 (PE Biosystems) in der PCR eingesetzt. Die Messung der Fluorescens als Maß für die Zunahme von Amplifizierungsprodukte erfolgte online mittels ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Biosystems). Die Reinheit der Amplifizierungsprodukte wurde durch die Aufnahme von Schmelzkurven überprüft. (siehe Figur 3b und 4)

Beispiel 3: Testsystem zum Auffinden von Substanzen, die die NTPase Aktivität beeinflussen.

[0046] Ein Standard NTPase Assay wurde folgendermaßen durchgeführt: Inkubation für 30 min bei 30°C. 5-30 pMol des gereinigten Mater-Proteins oder eines Fragmentes, das die NTPase Domäne umschließt, wurden in einem Reaktionspuffer [20 mM Tris/HCL pH7,5; 3 mM MgCl₂; 1 mM 2-mercaptoethanol; 10%Glycerol; 0,01% Triton X-100; 0,1mg/ml BSA; 11 µM[γ-³² P]NTP (0,5µCi)] inkubiert (Endvolumen 25 µl). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 mL aktivierter Kohle (2mg/ml) gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und 50 µl des Überstandes im Szintillationszähler (Cerenkov) gezählt. Substanzen, die die NTPase-Aktivität von Mater beeinflussen, werden dem Reaktionspuffer zugegeben.

Beispiel 4: Testsystem zum Auffinden von Substanzen, die die Nukleotidbindung an Mater verhindern.

[0047] Der Reaktionsmix [20 mM Tris/Hcl pH7,5; 3 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol; 10% Glycerol, 0,01% Triton X-100, 0,1mg/ml BSA und 50µM [γ-³²-P]ATP (0,5µCi)] mit 30-80 pMol gereinigtem Mater-Protein oder einem Fragment des Mater-Proteins, das die ATP-Bindungsstelle umfasst, wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem NaCl/P_i beendet und die Proben wurden durch BA85 Nitrocellulose-Filter microfiltriert. Die Nitrocellulose wurde anschließend 2mal mit 2 mL NaCl/P_i gewaschen, getrocknet und das gebundene [γ-³²-P]ATP nach Cerenkov gezählt. Substanzen, die die Bindung beeinflussen, werden dem Reaktionsmix zugefügt.

Beispiel 5: Testsystem zum Auffinden von Substanzen, die Apoptose induzieren (Cell death Assay)

[0048] Zum Auffinden von Substanzen, die Apoptose induzieren, wurde das in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pCDNA3.1 siehe Bsp1) klonierte Mater oder Teilsequenzen von Mater in eine eukaryontischen Zelle, z.B. MCF-7 mittels LipfectAMINE (Life Technology Inc) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen in 0,5% Glutaraldehyd fixiert und mit 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D galactopyranoside (X-gal) für 4h inkubiert. Die Zellen wurden im Phasenkontrastmikroskop visualisiert und der Anteil apoptotischer Zellen wurde ausgezählt. Substanzen, die die Apoptoseinduktion beeinflussen werden dem Zellkulturmedium (10%hitzeinaktiviertes

EP 1 285 964 A2

Fötale Kälberserum in RPMI1640) zugegeben.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

<120> Humanes Mater Protein

10 <130> 52174A

<140>

15 <141>

<160> 4

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3926

25 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

30 atggaaggag acaaatcgct caccttttcc agctacgggc tgcaatggtg tctctatgag 60

ctagacaagg aagaatttca gacattcaag gaattactaa agaagaaatc ttcagaatcg 120

accacatgct ctattccaca gtttgaaatc gagaatgcca acgtggaatg tctggcactc 180

35 ctcttgcatg agtattatgg agcatcgctg gcctgggcta cgtccattag catctttgaa 240

aacatgaacc tgcgaaccct ctcggaagaag gcacgggatg acatgaaaaa ttcaccagaa 300

gatectgaag caacgatgac tgaccaagga ccaagcaagg aaaaagtgcc agaaaataaa 360

tatggcatga ctaagcttat cttgggggtg tctgacatct ctgactcgaa taataaacac 420

40 aagtatgttg gaattcatte ttcttttgca gaaatttcac aagctatgga acaagaaggt 480

gccacagcag cagagacaga agaacaagaa atttcacaag ctatggaaca agaaggtgcc 540

acagcagcag agacagaaga acaaggacat ggaggtgaca catgggacta caagagtcac 600

gtgatgacca aattcgctga ggaggaggat gtacgtcgta gttttgaaaa cactgctgct 660

45 gactggccgg aaatgcaaac gttggctggt gcttttgatt cagaccggtg gggcttccgg 720

cctcgcacgg tggttctgca cggaaagtca ggaattggga aatcggctct agccagaagg 780

atcgtgctgt gctgggcgca aggtggactc taccagggaa tgttctccta cgtctctctc 840

ctccccgtta gagagatgca gcggaagaag gagagcagtg tcacagagtt catctccagg 900

50 gagtggccag actcccaggc tccggtgacg gagatcatgt cccgaccaga aaggctgttg 960

ttcatcattg acggtttcga tgacctgggc tctgtcctca acaatgacac aaagctctgc 1020

aaagactggg ctgagaagca gcctccgttc accctcatc gcagtctgct gaggaaggtc 1080

55 ctgctccctg agtccttcct gatcgtcacc gtcagagacg tgggcacaga gaagctcaag 1140

EP 1 285 964 A2

tcagaggctcg tgtctccccg ttacctgtta gttagaggaa tctccgggga acaaagaatc 1200
 cacttgctcc ttgagcgcg gattgggtgag catcagaaga cacaagggtt gcgtgcgcatc 1260
 5 atgaacaacc gtgagctgct cgaccagtgc cagggtgccc cctggtggctc tctcatctgc 1320
 gtggccctgc agctgcagga cgtggtgggg gagagcgctc ccccttcaa ccaaacgctc 1380
 acaggcctgc acgcgccttt tgtgtttcat cagctcacc ctcgaggcgt ggtccggcgc 1440
 tgtctcaatc tggaggaaag agttgtctg aagcgcttct gccgtatggc tgtggaggga 1500
 10 gtgtggaata ggaagtcagt gtttgacggt gacgacctca tgggtcaagg actcggggag 1560
 tctgagctcc gtgtctgtt tcacatgaac atccttctcc cagacagcca ctgtgaggag 1620
 taclacacct tcttccacct cagtctccag gacttctgtg ccgcttgta ctacgtgtta 1680
 gagggcctgg aaatcgagcc agctctctgc cctctgtacg ttgagaagac aaagaggctc 1740
 15 atggagctta aacaggcagg ctccatata cactcgcttt ggatgaagcg tttcttgttt 1800
 ggcctcgtga gcgaagacgt aaggaggcca ctggaggctc tgcgtggctg tcccgttccc 1860
 ctgggggtga agcagaagct tctgcactgg gtctctctgt tgggtcagca gcctaatagcc 1920
 20 accaccccag gagacacct ggacgccttc cactgtcttt tcgagactca agacaaagag 1980
 tttgttcgct tggcattaaa cagcttccaa gaagtgtggc tccgattaa ccagaacctg 2040
 gacttgatag catcttctct ctgcctccag cactgtccgt atttgcggaa aattcgggtg 2100
 gatgtcaaag g gatcttccc aagagatgag tccgtgagg catgtctctgt ggtccctcta 2160
 25 tggatgcggg ataagacct cattgaggag cagtgggaag atttctgctc catgcttggc 2220
 accacccac acctgcggca gctggacctg ggcagcagca tctgacaga gcgggccatg 2280
 aagacctgt gtgccaagct gaggcattccc acctgcaaga tacagacct gatgtttaga 2340
 30 aatgcacaga ttacctctgg tgtgcagcac ctctggagaa tcgtcatggc caaccgtaac 2400
 ctaagatccc tcaacttggg aggcacccac ctgaaggaag aggatgtaag gatggcgtgt 2460
 gaagccttaa aacacccaaa atgtttgttg gagtcttga ggctggattg ctgtggattg 2520
 acctatgcct gttacctgaa gatctcccaa atccttacga cctccccag cctgaaatct 2580
 35 ctgagcctgg caggaaacaa ggtgacagac caggagtaa tgcctctcag tgatgccttg 2640
 agagtctccc agtgcgcct gcagaagctg atactggagg actgtggcat cacagccacg 2700
 ggttgccaga gtctggcctc agccctcgtc agcaaccgga gcttgacaca cctgtgccta 2760
 tccaacaaca gcctggggaa cgaagggtga aatctactgt gtcgatccat gaggttccc 2820
 40 cactgtagtc tgcagaggct gatgtgaat cagtgccacc tggacacggc tggctgtggt 2880
 tttctgcac ttgcgttat gggttaactca tggctgacgc acctgagcct tagcatgaac 2940
 cctgtggaag acaatggcgt gaagcttctg tgcgaggtea tgagagaacc atcttgtcat 3000
 ctccaggacc tggagttggt aaagtgtcat ctaccgccc cgtgctgtga gagtctgtcc 3060
 45 tgtgtgatct cgaggagcag acacctgaag agcctggatc tcacggacaa tgccttgggt 3120
 gacggtgggg ttgctgcact gtgcgaggga ctgaagcaaa agaacagtgt tctgacgaga 3180
 ctcggttga aggcattgtg actgacttct gattgtgtg aggcactctc cttggccctt 3240
 50 tctgcaacc ggcatctgac cagtctaaac ctggtgcaga ataacttcag tcccaaagga 3300
 atgatgaagc tgtgttcggc ctttgcctgt cccacgtcta acttacagat aattgggctg 3360
 tggaaatggc agtacctgt gcaaataagg aagctgctgg aggaagtga gctactcaag 3420
 ccccgagtcg taattgacgg tagttggcat tcttttgatg aagatgaccg gtactggtgg 3480
 55 aaaaactgaa gatacggaaa cctgcccac tcacaccoat ctgatggagg aactttaaac 3540

EP 1 285 964 A2

gctgttttct cagagcaagc tatgcacctg ggagttcctt ctcaaagatg gagaatgatt 3600
tctgattctc acaaagccct caatggtagt gattcttctg tgttcactct acgttggtta 3660
ctggatttga aggctagaga ccttcaagtc ataggactca gtatctgtga aatgtccgtc 3720
5 atatctcaga gcatatagag ggaattaaat aaacacaaag catttggaag agttgtcaag 3780
tggttttctt aactagtga gatattggtt aggagcagag aggttgggag gacctagatc 3840
ttcaaaagaa gccctgaat ttgggtacca caactagtgg tggttttttg ttttttgtgt 3900
10 ttttcttttt gttttttgt tttttt 3926

<210> 2

<211> 1162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Trp

1 5 10 15

Cys Leu Tyr Glu Leu Asp Lys Glu Glu Phe Gln Thr Phe Lys Glu Leu

20 25 30

Leu Lys Lys Lys Ser Ser Glu Ser Thr Thr Cys Ser Ile Pro Gln Phe

35 40 45

Glu Ile Glu Asn Ala Asn Val Glu Cys Leu Ala Leu Leu Leu His Glu

50 55 60

Tyr Tyr Gly Ala Ser Leu Ala Trp Ala Thr Ser Ile Ser Ile Phe Glu

65 70 75 80

Asn Met Asn Leu Arg Thr Leu Ser Glu Lys Ala Arg Asp Asp Met Lys

85 90 95

Asn Ser Pro Glu Asp Pro Glu Ala Thr Met Thr Asp Gln Gly Pro Ser

100 105 110

Lys Glu Lys Val Pro Glu Asn Lys Tyr Gly Met Thr Lys Leu Ile Leu

115 120 125

Gly Val Ser Asp Ile Ser Asp Ser Asn Asn Lys His Lys Tyr Val Gly

130 135 140

EP 1 285 964 A2

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Ile His Ser Ser Phe Ala Glu Ile Ser Gln Ala Met Glu Gln Glu Gly
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu Glu Gln Glu Ile Ser Gln Ala Met Glu
 165 170 175
 Gln Glu Gly Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu Glu Gln Gly His Gly Gly
 180 185 190
 Asp Thr Trp Asp Tyr Lys Ser His Val Met Thr Lys Phe Ala Glu Glu
 195 200 205
 Glu Asp Val Arg Arg Ser Phe Glu Asn Thr Ala Ala Asp Trp Pro Glu
 210 215 220
 Met Gln Thr Leu Ala Gly Ala Phe Asp Ser Asp Arg Trp Gly Phe Arg
 225 230 235 240
 Pro Arg Thr Val Val Leu His Gly Lys Ser Gly Ile Gly Lys Ser Ala
 245 250 255
 Leu Ala Arg Arg Ile Val Leu Cys Trp Ala Gln Gly Gly Leu Tyr Gln
 260 265 270
 Gly Met Phe Ser Tyr Val Phe Phe Leu Pro Val Arg Glu Met Gln Arg
 275 280 285
 Lys Lys Glu Ser Ser Val Thr Glu Phe Ile Ser Arg Glu Trp Pro Asp
 290 295 300
 Ser Gln Ala Pro Val Thr Glu Ile Met Ser Arg Pro Glu Arg Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ile Asp Gly Phe Asp Asp Leu Gly Ser Val Leu Asn Asn Asp
 325 330 335
 Thr Lys Leu Cys Lys Asp Trp Ala Glu Lys Gln Pro Pro Phe Thr Leu
 340 345 350

EP 1 285 964 A2

	Ile Arg Ser Leu Leu Arg Lys Val Leu Leu Pro Glu Ser Phe Leu Ile	
	355	360 365
5	Val Thr Val Arg Asp Val Gly Thr Glu Lys Leu Lys Ser Glu Val Val	
	370	375 380
10	Ser Pro Arg Tyr Leu Leu Val Arg Gly Ile Ser Gly Glu Gln Arg Ile	
	385	390 395 400
15	His Leu Leu Leu Glu Arg Gly Ile Gly Glu His Gln Lys Thr Gln Gly	
	405	410 415
20	Leu Arg Ala Ile Met Asn Asn Arg Glu Leu Leu Asp Gln Cys Gln Val	
	420	425 430
25	Pro Ala Val Gly Ser Leu Ile Cys Val Ala Leu Gln Leu Gln Asp Val	
	435	440 445
30	Val Gly Glu Ser Val Ala Pro Phe Asn Gln Thr Leu Thr Gly Leu His	
	450	455 460
35	Ala Ala Phe Val Phe His Gln Leu Thr Pro Arg Gly Val Val Arg Arg	
	465	470 475 480
40	Cys Leu Asn Leu Glu Glu Arg Val Val Leu Lys Arg Phe Cys Arg Met	
	485	490 495
45	Ala Val Glu Gly Val Trp Asn Arg Lys Ser Val Phe Asp Gly Asp Asp	
	500	505 510
50	Leu Met Val Gln Gly Leu Gly Glu Ser Glu Leu Arg Ala Leu Phe His	
	515	520 525
55	Met Asn Ile Leu Leu Pro Asp Ser His Cys Glu Glu Tyr Tyr Thr Phe	
	530	535 540
60	Phe His Leu Ser Leu Gln Asp Phe Cys Ala Ala Leu Tyr Tyr Val Leu	
	545	550 555 560
65	Glu Gly Leu Glu Ile Glu Pro Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Val Glu Lys	

EP 1 285 964 A2

	565	570	575
5	Thr Lys Arg Ser Met Glu Leu Lys Gln Ala Gly Phe His Ile His Ser		
	580	585	590
10	Leu Trp Met Lys Arg Phe Leu Phe Gly Leu Val Ser Glu Asp Val Arg		
	595	600	605
15	Arg Pro Leu Glu Val Leu Leu Gly Cys Pro Val Pro Leu Gly Val Lys		
	610	615	620
20	Gln Lys Leu Leu His Trp Val Ser Leu Leu Gly Gln Gln Pro Asn Ala		
	625	630	635
25	Thr Thr Pro Gly Asp Thr Leu Asp Ala Phe His Cys Leu Phe Glu Thr		
	645	650	655
30	Gln Asp Lys Glu Phe Val Arg Leu Ala Leu Asn Ser Phe Gln Glu Val		
	660	665	670
35	Trp Leu Pro Ile Asn Gln Asn Leu Asp Leu Ile Ala Ser Ser Phe Cys		
	675	680	685
40	Leu Gln His Cys Pro Tyr Leu Arg Lys Ile Arg Val Asp Val Lys Gly		
	690	695	700
45	Ile Phe Pro Arg Asp Glu Ser Ala Glu Ala Cys Pro Val Val Pro Leu		
	705	710	715
50	Trp Met Arg Asp Lys Thr Leu Ile Glu Glu Gln Trp Glu Asp Phe Cys		
	725	730	735
55	Ser Met Leu Gly Thr His Pro His Leu Arg Gln Leu Asp Leu Gly Ser		
	740	745	750
60	Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ala Met Lys Thr Leu Cys Ala Lys Leu Arg		
	755	760	765
65	His Pro Thr Cys Lys Ile Gln Thr Leu Met Phe Arg Asn Ala Gln Ile		
	770	775	780

EP 1 285 964 A2

5	Thr Pro Gly Val Gln His Leu Trp Arg Ile Val Met Ala Asn Arg Asn	785	790	795	800
10	Leu Arg Ser Leu Asn Leu Gly Gly Thr His Leu Lys Glu Glu Asp Val	805	810	815	
15	Arg Met Ala Cys Glu Ala Leu Lys His Pro Lys Cys Leu Leu Glu Ser	820	825	830	
20	Leu Arg Leu Asp Cys Cys Gly Leu Thr His Ala Cys Tyr Leu Lys Ile	835	840	845	
25	Ser Gln Ile Leu Thr Thr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Leu Ser Leu Ala	850	855	860	
30	Gly Asn Lys Val Thr Asp Gln Gly Val Met Pro Leu Ser Asp Ala Leu	865	870	875	880
35	Arg Val Ser Gln Cys Ala Leu Gln Lys Leu Ile Leu Glu Asp Cys Gly	885	890	895	
40	Ile Thr Ala Thr Gly Cys Gln Ser Leu Ala Ser Ala Leu Val Ser Asn	900	905	910	
45	Arg Ser Leu Thr His Leu Cys Leu Ser Asn Asn Ser Leu Gly Asn Glu	915	920	925	
50	Gly Val Asn Leu Leu Cys Arg Ser Met Arg Leu Pro His Cys Ser Leu	930	935	940	
55	Gln Arg Leu Met Leu Asn Gln Cys His Leu Asp Thr Ala Gly Cys Gly	945	950	955	960
	Phe Leu Ala Leu Ala Leu Met Gly Asn Ser Trp Leu Thr His Leu Ser	965	970	975	
	Leu Ser Met Asn Pro Val Glu Asp Asn Gly Val Lys Leu Leu Cys Glu	980	985	990	

EP 1 285 964 A2

Val Met Arg Glu Pro Ser Cys His Leu Gln Asp Leu Glu Leu Val Lys
995 1000 1005

5
Cys His Leu Thr Ala Ala Cys Cys Glu Ser Leu Ser Cys Val Ile Ser
1010 1015 1020

10
Arg Ser Arg His Leu Lys Ser Leu Asp Leu Thr Asp Asn Ala Leu Gly
1025 1030 1035 1040

15
Asp Gly Gly Val Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Lys Gln Lys Asn Ser
1045 1050 1055

20
Val Leu Thr Arg Leu Gly Leu Lys Ala Cys Gly Leu Thr Ser Asp Cys
1060 1065 1070

25
Cys Glu Ala Leu Ser Leu Ala Leu Ser Cys Asn Arg His Leu Thr Ser
1075 1080 1085

30
Leu Asn Leu Val Gln Asn Asn Phe Ser Pro Lys Gly Met Met Lys Leu
1090 1095 1100

35
Cys Ser Ala Phe Ala Cys Pro Thr Ser Asn Leu Gln Ile Ile Gly Leu
1105 1110 1115 1120

40
Trp Lys Trp Gln Tyr Pro Val Gln Ile Arg Lys Leu Leu Glu Glu Val
1125 1130 1135

45
Gln Leu Leu Lys Pro Arg Val Val Ile Asp Gly Ser Trp His Ser Phe
1140 1145 1150

50
Asp Glu Asp Asp Arg Tyr Trp Trp Lys Asn
1155 1160

55
<210> 3
<211> 3830
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3

EP 1 285 964 A2

atggaaggag acaaatcgct caccttttcc agctacgggc tgcaatgggtg tctctatgag 60
 ctagacaagg aagaatttca gacattcaag gaattactaa agaagaaatc ttcagaatcg 120
 5 accacatgct ctattccaca gtttgaaatc gagaatgcca acgtggaatg tctggcactc 180
 ctcttgcatg agtattatgg agcatcgctg gcctgggcta cgtccattag catctttgaa 240
 aacatgaacc tgcgaaccct ctcggaagaag gcacgggatg acatgaaaaa ttcaccagaa 300
 gatcctgaag caacgatgac tgaccaagga ccaagcaagg aaaaagtgcc agaaaataaa 360
 10 tatggcatga ctaagcttat cttgggggtg tctgacatct ctgactcgaa taataaacac 420
 aagtatgttg gaattcattc ttcttttgca gaaatttcac aagctatgga acaagaagggt 480
 gccacagcag cagagacaga agaacaagga catggagggtg acacatggga ctacaagagt 540
 cacytgatga ccaaattcgc tgaggaggag gatgtacgtc gtagttttga aaacactgct 600
 15 gctgactggc cggaaatgca aacgttggct ggtgcttttg attcagaccg gtggggcttc 660
 cggcctcgca cggtggttct gcacggaaag tcaggaattg ggaaatcggc tctagccaga 720
 aggatcgtgc tgtgctgggc gcaaggtgga ctctaccagg gaatgttctc ctacgtcttc 780
 20 ttcttccccg ttagagagat gcagcggaaag aaggagagca gtgtcacaga gttcatctcc 840
 agggagtggc cagactccca ggctccggtg acggagatca tgtcccgacc agaaaggctg 900
 ttgttcatca ttgacggttt cgatgacctg ggctctgtcc tcaacaatga cacaaagctc 960
 tgcaaagact gggctgagaa gcagcctccg ttaccctca tacgcagtct gctgaggaag 1020
 25 gtctgtctcc ctgagtcctt cctgacgtc accgtcagag acgtgggcac agagaagctc 1080
 aagtcagagg tcgtgtctcc ccgttacctg ttagttagag gaatctccgg ggaacaaaga 1140
 atccacttgc tccttgagcg cgggatttgt gagcatcaga agacacaagg gttgcgtgcg 1200
 30 atcatgaaca accgtgagct gctcgaccag tgccagggtg ccgccgtggg ctctctcacc 1260
 tgcggtggcc tgcagctgca ggacgtggtg ggggagagcg tcgccccctt caaccaaacg 1320
 ctacagggcc tgcacgcgcg ttttgtgttt catcagctca cccctcgagg cgtggtccgg 1380
 cgctgtctca atctggagga aagagttgtc ctgaagcgct tctgccgtat ggctgtggag 1440
 35 ggagtgtgga ataggaagtc agtgtttgac ggtgacgacc tcatggttca aggactcggg 1500
 gagtctgagc tccgtgctct gtttcacatg aacatccttc tcccagacag ccaactgtgag 1560
 gagtactaca ccttcttcca cctcagtctc caggacttct gtgccgcctt gtactacgtg 1620
 ttagagggcc tggaaatcga gccagctctc tgccctctgt acgttgagaa gacaaagagg 1680
 40 tccatggagc ttaaacaggc aggttccat atccactcgc tttggatgaa gcgtttcttg 1740
 tttggcctcg tgagcgaaga cgtaaggagg ccaactggagg tcctgctggg ctgtcccgtt 1800
 cccctggggg tgaagcagaa gcttctgcac tgggtctctc tgttgggtca gcagcctaat 1860
 gccaccaccc caggagacac cctggacgcc ttccactgtc ttttcgagac tcaagacaaa 1920
 45 gagtttgttc gcttggcatt aaacagcttc caagaagtgt ggcttccgat taaccagaac 1980
 ctggacttga tagcatcttc cttctgcctc cagcactgtc cgtatttgcg gaaaattcgg 2040
 gtggatgtca aagggatctt cccaagagat gagtccgtg aggcattgtc tgtggtccct 2100
 50 ctatggatgc gggataagac cctcattgag gagcagtggg aagatttctg ctccatgctt 2160
 ggcaccaccc cacacctgcg gcagctggac ctgggcagca gcatcctgac agagcggggc 2220
 atgaagaccc tgtgtgccaa gctgaggcat cccacctgca agatacagac cctgatgttt 2280
 agaaatgcac agattacccc tgggtgtgcag cacctctgga gaatcgteat ggccaaccgt 2340
 55 aacctaagat ccctcaactt gggaggcacc cacctgaagg aagaggatgt aaggatggcg 2400

EP 1 285 964 A2

5 tgtgaagcct taaaacaccc aaaatgtttg ttggagtcct tgaggctgga ttgctgtgga 2460
 ttgacccatg cctgttacct gaagatctcc caaatcctta cgacctcccc cagcctgaaa 2520
 tctctgagcc tggcaggaaa caagggtgaca gaccagggag taatgcctct cagtgatgcc 2580
 ttgagagtct cccagtgcgc cctgcagaag ctgatactgg aggactgtgg catcacagcc 2640
 acgggttgcc agagtctggc ctcagccctc gtcagcaacc ggagcttgac acacctgtgc 2700
 10 ctatccaaca acagcctggg gaacgaagggt gtaaactctac tgtgtcgatc catgaggctt 2760
 ccccaactgta gtctgcagag gctgatgctg aatcagtgcc acctggacac ggctggctgt 2820
 ggttttcttg cacttgccgt tatgggtaac tcatggctga cgcacctgag ccttagcatg 2880
 aaccctgtgg aagacaatgg cgtgaagctt ctgtgcgagg tcatgagaga accatcttgt 2940
 15 catctccagg acctggagtt ggtaaagtgt catctcaccg ccgcgtgctg tgagagtctg 3000
 tcctgtgtga tctcgaggag cagacacctg aagagcctgg atctcacgga caatgccctg 3060
 ggtgacggtg gggttgctgc actgtgcgag ggactgaagc aaaagaacag tgttctgacg 3120
 agactcgggt tgaaggcatg tggactgact tctgattgct gtgaggcact ctcttggcc 3180
 20 ctttcttgca accggcatct gaccagtcta aacctggtgc agaataactt cagtccaaa 3240
 ggaatgatga agctgtgttc ggcctttgcc tgtcccacgt ctaacttaca gataattggg 3300
 ctgtggaaat ggcagtaccc tgtgcaaata aggaagctgc tggaggaagt gcagctactc 3360
 aagccccgag tcgtaattga cggtagttgg cattcttttg atgaagatga ccggtactgg 3420
 25 tggaaaaact gaagatacgg aaacctgccc cactcacacc catctgatgg aggaacttta 3480
 aacgctgttt tctcagagca agctatgcac ctgggagttc cttctcaaag atggagaatg 3540
 atttctgatt ctcaaaagc cctcaatggt agtgattctt ctgtgttcac tctacgttgg 3600
 30 ttactggatt tgaaggctag agaccttcaa gtcataggac tcagtatctg tgaaatgtcc 3660
 gtcatatctc agagcatata gagggaatta aataaacaca aagcatttgg aaaagttgtc 3720
 aagtggtttt cttaactagt ggagatatgg tttaggagca gagagggttg gaggacctag 3780
 atcttcaaaa gaagccctg aatttgggta ccacaactag tgggtggttt 3830

35

<210> 4

<211> 1143

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<400> 4

45

Met Glu Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Trp
 1 5 10 15

50

Cys Leu Tyr Glu Leu Asp Lys Glu Glu Phe Gln Thr Phe Lys Glu Leu
 20 25 30

55

Leu Lys Lys Lys Ser Ser Glu Ser Thr Thr Cys Ser Ile Pro Gln Phe
 35 40 45

EP 1 285 964 A2

Glu Ile Glu Asn Ala Asn Val Glu Cys Leu Ala Leu Leu Leu His Glu
 50 55 60
 5
 Tyr Tyr Gly Ala Ser Leu Ala Trp Ala Thr Ser Ile Ser Ile Phe Glu
 65 70 75 80
 10
 Asn Met Asn Leu Arg Thr Leu Ser Glu Lys Ala Arg Asp Asp Met Lys
 85 90 95
 15
 Asn Ser Pro Glu Asp Pro Glu Ala Thr Met Thr Asp Gln Gly Pro Ser
 100 105 110
 20
 Lys Glu Lys Val Pro Glu Asn Lys Tyr Gly Met Thr Lys Leu Ile Leu
 115 120 125
 25
 Gly Val Ser Asp Ile Ser Asp Ser Asn Asn Lys His Lys Tyr Val Gly
 130 135 140
 30
 Ile His Ser Ser Phe Ala Glu Ile Ser Gln Ala Met Glu Gln Glu Gly
 145 150 155 160
 35
 Ala Thr Ala Ala Glu Thr Glu Glu Gln Gly His Gly Gly Asp Thr Trp
 165 170 175
 40
 Asp Tyr Lys Ser His Val Met Thr Lys Phe Ala Glu Glu Glu Asp Val
 180 185 190
 45
 Arg Arg Ser Phe Glu Asn Thr Ala Ala Asp Trp Pro Glu Met Gln Thr
 195 200 205
 50
 Leu Ala Gly Ala Phe Asp Ser Asp Arg Trp Gly Phe Arg Pro Arg Thr
 210 215 220
 55
 Val Val Leu His Gly Lys Ser Gly Ile Gly Lys Ser Ala Leu Ala Arg
 225 230 235 240
 60
 Arg Ile Val Leu Cys Trp Ala Gln Gly Gly Leu Tyr Gln Gly Met Phe
 245 250 255
 65
 Ser Tyr Val Phe Phe Leu Pro Val Arg Glu Met Gln Arg Lys Lys Glu

EP 1 285 964 A2

	260	265	270
5	Ser Ser Val Thr Glu Phe Ile Ser Arg Glu Trp Pro Asp Ser Gln Ala		
	275	280	285
10	Pro Val Thr Glu Ile Met Ser Arg Pro Glu Arg Leu Leu Phe Ile Ile		
	290	295	300
15	Asp Gly Phe Asp Asp Leu Gly Ser Val Leu Asn Asn Asp Thr Lys Leu		
	305	310	315 320
20	Cys Lys Asp Trp Ala Glu Lys Gln Pro Pro Phe Thr Leu Ile Arg Ser		
	325	330	335
25	Leu Leu Arg Lys Val Leu Leu Pro Glu Ser Phe Leu Ile Val Thr Val		
	340	345	350
30	Arg Asp Val Gly Thr Glu Lys Leu Lys Ser Glu Val Val Ser Pro Arg		
	355	360	365
35	Tyr Leu Leu Val Arg Gly Ile Ser Gly Glu Gln Arg Ile His Leu Leu		
	370	375	380
40	Leu Glu Arg Gly Ile Gly Glu His Gln Lys Thr Gln Gly Leu Arg Ala		
	385	390	395 400
45	Ile Met Asn Asn Arg Glu Leu Leu Asp Gln Cys Gln Val Pro Ala Val		
	405	410	415
50	Gly Ser Leu Ile Cys Val Ala Leu Gln Leu Gln Asp Val Val Gly Glu		
	420	425	430
55	Ser Val Ala Pro Phe Asn Gln Thr Leu Thr Gly Leu His Ala Ala Phe		
	435	440	445
60	Val Phe His Gln Leu Thr Pro Arg Gly Val Val Arg Arg Cys Leu Asn		
	450	455	460
65	Leu Glu Glu Arg Val Val Leu Lys Arg Phe Cys Arg Met Ala Val Glu		
	465	470	475 480

EP 1 285 964 A2

5	Gly Val Trp Asn Arg Lys Ser Val Phe Asp Gly Asp Asp Leu Met Val	485	490	495
10	Gln Gly Leu Gly Glu Ser Glu Leu Arg Ala Leu Phe His Met Asn Ile	500	505	510
15	Leu Leu Pro Asp Ser His Cys Glu Glu Tyr Tyr Thr Phe Phe His Leu	515	520	525
20	Ser Leu Gln Asp Phe Cys Ala Ala Leu Tyr Tyr Val Leu Glu Gly Leu	530	535	540
25	Glu Ile Glu Pro Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Val Glu Lys Thr Lys Arg	545	550	555
30	Ser Met Glu Leu Lys Gln Ala Gly Phe His Ile His Ser Leu Trp Met	565	570	575
35	Lys Arg Phe Leu Phe Gly Leu Val Ser Glu Asp Val Arg Arg Pro Leu	580	585	590
40	Glu Val Leu Leu Gly Cys Pro Val Pro Leu Gly Val Lys Gln Lys Leu	595	600	605
45	Leu His Trp Val Ser Leu Leu Gly Gln Gln Pro Asn Ala Thr Thr Pro	610	615	620
50	Gly Asp Thr Leu Asp Ala Phe His Cys Leu Phe Glu Thr Gln Asp Lys	625	630	635
55	Glu Phe Val Arg Leu Ala Leu Asn Ser Phe Gln Glu Val Trp Leu Pro	645	650	655
	Ile Asn Gln Asn Leu Asp Leu Ile Ala Ser Ser Phe Cys Leu Gln His	660	665	670
	Cys Pro Tyr Leu Arg Lys Ile Arg Val Asp Val Lys Gly Ile Phe Pro	675	680	685

EP 1 285 964 A2

	Arg Asp Glu Ser Ala Glu Ala Cys Pro Val Val Pro Leu Trp Met Arg	
	690	695 700
5	Asp Lys Thr Leu Ile Glu Glu Gln Trp Glu Asp Phe Cys Ser Met Leu	
	705	710 715 720
10	Gly Thr His Pro His Leu Arg Gln Leu Asp Leu Gly Ser Ser Ile Leu	
		725 730 735
15	Thr Glu Arg Ala Met Lys Thr Leu Cys Ala Lys Leu Arg His Pro Thr	
		740 745 750
20	Cys Lys Ile Gln Thr Leu Met Phe Arg Asn Ala Gln Ile Thr Pro Gly	
		755 760 765
25	Val Gln His Leu Trp Arg Ile Val Met Ala Asn Arg Asn Leu Arg Ser	
		770 775 780
30	Leu Asn Leu Gly Gly Thr His Leu Lys Glu Glu Asp Val Arg Met Ala	
		785 790 795 800
35	Cys Glu Ala Leu Lys His Pro Lys Cys Leu Leu Glu Ser Leu Arg Leu	
		805 810 815
40	Asp Cys Cys Gly Leu Thr His Ala Cys Tyr Leu Lys Ile Ser Gln Ile	
		820 825 830
45	Leu Thr Thr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys	
		835 840 845
50	Val Thr Asp Gln Gly Val Met Pro Leu Ser Asp Ala Leu Arg Val Ser	
		850 855 860
55	Gln Cys Ala Leu Gln Lys Leu Ile Leu Glu Asp Cys Gly Ile Thr Ala	
		865 870 875 880
60	Thr Gly Cys Gln Ser Leu Ala Ser Ala Leu Val Ser Asn Arg Ser Leu	
		885 890 895
65	Thr His Leu Cys Leu Ser Asn Asn Ser Leu Gly Asn Glu Gly Val Asn	

EP 1 285 964 A2

	900	905	910
5	Leu Leu Cys Arg Ser Met Arg	Leu Pro His Cys Ser	Leu Gln Arg Leu
	915	920	925
10	Met Leu Asn Gln Cys His Leu Asp Thr Ala Gly Cys Gly Phe Leu Ala		
	930	935	940
15	Leu Ala Leu Met Gly Asn Ser Trp Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Met		
	945	950	955 960
20	Asn Pro Val Glu Asp Asn Gly Val Lys Leu Leu Cys Glu Val Met Arg		
	965	970	975
25	Glu Pro Ser Cys His Leu Gln Asp Leu Glu Leu Val Lys Cys His Leu		
	980	985	990
30	Thr Ala Ala Cys Cys Glu Ser Leu Ser Cys Val Ile Ser Arg Ser Arg		
	995	1000	1005
35	His Leu Lys Ser Leu Asp Leu Thr Asp Asn Ala Leu Gly Asp Gly Gly		
	1010	1015	1020
40	Val Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Lys Gln Lys Asn Ser Val Leu Thr		
	1025	1030	1035 1040
45	Arg Leu Gly Leu Lys Ala Cys Gly Leu Thr Ser Asp Cys Cys Glu Ala		
	1045	1050	1055
50	Leu Ser Leu Ala Leu Ser Cys Asn Arg His Leu Thr Ser Leu Asn Leu		
	1060	1065	1070
55	Val Gln Asn Asn Phe Ser Pro Lys Gly Met Met Lys Leu Cys Ser Ala		
	1075	1080	1085
60	Phe Ala Cys Pro Thr Ser Asn Leu Gln Ile Ile Gly Leu Trp Lys Trp		
	1090	1095	1100
65	Gln Tyr Pro Val Gln Ile Arg Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu		
	1105	1110	1115 1120

Lys Pro Arg Val Val Ile Asp Gly Ser Trp His Ser Phe Asp Glu Asp
 1125 1130 1135

Asp Arg Tyr Trp Trp Lys Asn
 1140

Patentansprüche

1. Nukleinsäure umfassend

- a. die in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 dargestellte Nukleotidsequenz,
- b. eine einer Sequenz aus a. im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
- c. eine mit den Sequenzen aus a. oder b. unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz mit der Funktion eines humanen MATER-Proteins.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1 umfassend einen Protein-kodierenden Abschnitt der in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz.

3. Nukleinsäure, kodierend für ein Polypeptid mit der in Seq ID NO 2 oder Seq ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenz.

4. Polypeptide kodiert von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3.

5. Polypeptid, umfassend die in Seq ID NO 2 oder in Seq ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz oder Teile davon.

6. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 4 und 5 oder von Teilen dieses Polypeptids zur Herstellung von Antikörpern.

7. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 4 und 5.

8. Verwendung einer Sonde mit Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zu den Nukleinsäuresequenzen nach Anspruch 1-3 sind, zur Herstellung einer Reagenz zum Nachweis der Gegenwart von mRNA und nach einem der Ansprüche 1-3 in Zellen.

9. Antisense-Molekül, das gegen die Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gerichtet ist.

10. Vektor enthaltend mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3.

11. Zelle transfiziert mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3 oder mit einem Vektor nach Anspruch 9.

12. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 11 zur Expression der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3.

13. Verwendung

- a. einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
- b. eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 4 und 5 oder
- c. einer Zelle nach Anspruch 11

zur Identifizierung von Effektoren eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5.

14. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 1 bis 3 oder eines Polypeptids nach Anspruch 4 und 5 oder des Antikörpers gemäß Anspruch 7 oder eines Antisense-Moleküls nach Anspruch 9 als Zielsubstanz zur Herstellung eines Mittels für Krankheiten, die ursächlich mit dem MATER-Gen und / oder Protein zusammenhängen.

15. Testsystem zur Identifizierung von Effektoren eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5, wobei ein erfindungsgemäßes Polypeptid als ganzes oder Teilsequenzen davon mit Domänen anderer Proteine in Kontakt gebracht wird und deren Interaktion gemessen wird.

16. Testsystem nach Anspruch 15, wobei die Effektoren die Interaktion der Polypeptide oder Teilsequenzen mit Domänen anderer Proteine aktivieren oder inhibieren.

17. Testsystem zur Identifizierung von Effektoren eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5, wobei ein erfindungsgemäßes Polypeptid als ganzes oder Teilsequenzen davon mit einem Modulator (Effektor) inkubiert werden und die Menge an hydrolysiertem NTP detektiert wird.

18. Testsystem nach Anspruch 14 oder 17 wobei die Effektoren die NTPase Aktivität inhibieren oder aktivieren.

19. Testsystem zur Identifizierung von Effektoren der NTPase Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids nach Anspruch 17 in einer erfindungsgemäßen Zelle mit Messung der intrazellulären Phosphorylierung.

20. Verfahren zur Bereitstellung eines pharmazeutischen Mittels, wobei

- a. Substanzen mit einem Testsystem nach Anspruch 17 - 19 in Kontakt gebracht werden.
- b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird
- c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Aktivität des Polypeptids gemäß Anspruch 4 oder 5 zeigt, identifiziert wird
- d. und die in Schritt c. identifizierte Substanz mit in der Pharmazie üblichen Formulierungsstoffen gemischt wird.

21. Diagnose-Verfahren zur Bestimmung von Autoimmun-Antikörpern gegen MATER in Körperproben (Gewebe, Flüssigkeiten).

22. Diagnose-Verfahren zur Bestimmung der Menge an Mater-Protein oder Mater mRNA in Eizellen.

23. DNA-Chip, **dadurch gekennzeichnet, dass** mindestens ein Oligonukleotid immobilisiert ist, das der vollständigen cDNA-Sequenz oder einer Teilsequenz bzw. komplementären Sequenz zu der in Seq ID NO 1 oder Seq ID NO 3 beschrieben, entspricht.

24. Verwendung eines DNA-Chips nach Anspruch 20 zur Diagnose von Fertilitätsstörungen.

25. Verwendung von Modulatoren der Mater Expression zur Behandlung von durch Endometriose bedingten Fertilitätsstörungen.

26. Methode zur Inhibierung der Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 in einer Zelle umfassend das Inkontaktbringen des erfindungsgemäßen Polypeptids mit einem Effektor auffindbar mit einem Testsystem nach Anspruch 17 - 19.

mmMater	<u>DSCEETITGYEM</u> ESTLLISTTR <u>LKCLSLAKNRVGVKSMISL</u> GNALSSSMCL <u>LOKLIILLNC</u>
hs_mater	<u>DGGGLTHACYER</u> ESQILTTSPS <u>LKSLSLAGNKVTDGCMPI</u> SDALRVSCA <u>LOKLIILLNC</u>
	*****: * : * : *****: * : * : *****
mmMater	<u>GLTPASCHRE</u> VSALFSNON <u>THLCLSNNSLGTEGVQOOLCOFLRNPECA</u> <u>LORLIENHCNIV</u>
hs_mater	<u>GITATGCQSD</u> ASALVSNRS <u>THLCLSNNSLGTEGVQOOLCOFLRNPECA</u> <u>LORLIENHCNIV</u>
	*****: * : * : *****: * : * : *****
mmMater	<u>DDAYGFL</u> AMRLANNT <u>KLTHLSLTMPVGDGAMKL</u> LCEALKEPTCY <u>LOEELVDCOLTQNG</u>
hs_mater	<u>TAGCGFL</u> ALALMGNSW <u>KLTHLSLTMPVGDGAMKL</u> LCEVMREPSCH <u>LOEELVDCOLTQNG</u>
	*****: * : * : *****: * : * : *****
mmMater	<u>CEPRACMITTTKH</u> LKSLDLCNNALGDKGVIT <u>CEGLKQSSSLRRGLGACKLTSNCEA</u>
hs_mater	<u>CESTSCVISRSRH</u> LKSLDLCNNALGDKGVIT <u>CEGLKQSSSLRRGLGACKLTSNCEA</u>
	*****: * : * : *****: * : * : *****
mmMater	<u>SLAISCNPH</u> LNSLNLVKNDFSTSGHKL <u>CSAFQCPVSNLGIIGLWQOYQYARVRROEE</u>
hs_mater	<u>SLAISCNRH</u> LNSLNLVKNDFSTSGHKL <u>CSAFQCPVSNLGIIGLWQOYQYARVRROEE</u>
	*****: * : * : *****: * : * : *****
mmMater	VEFVKPHVVIDGDWYASDEDDRNWKN
hs_mater	VQLKPRVVIDGSHWSEDDRYWKN
	*****: * : * : *****: * : * : *****

FIG 2.

Domain	sub#	Aminosäuren	
		from	to
Dapin domain		1	92
NACHT domain		243	563
DUF		570	720
LRR	1/14	745	763
LRR	2/14	774	791
LRR	3/14	801	816
LRR	4/14	830	848
LRR	5/14	858	876
LRR	6/14	888	905
LRR	7/14	915	930
LRR	8/14	944	962
LRR	9/14	972	989
LRR	10/14	1001	1019
LRR	11/14	1029	1047
LRR	12/14	1058	1076
LRR	13/14	1086	1103
LRR	14/14	1115	1133

Fig: 3 a

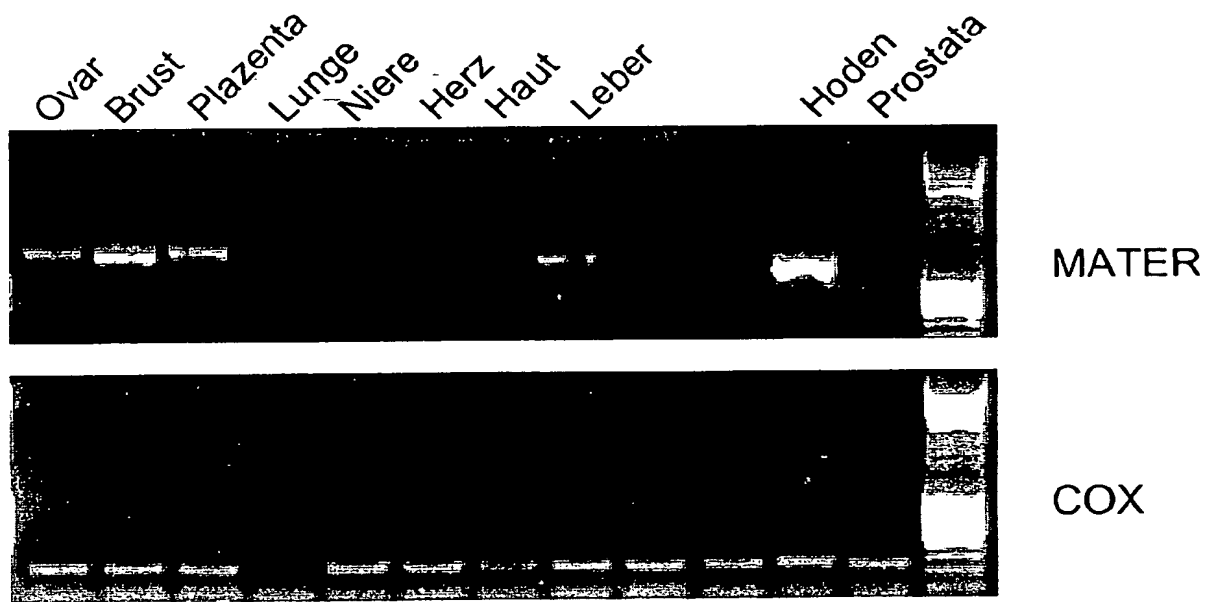


Fig. 3 b

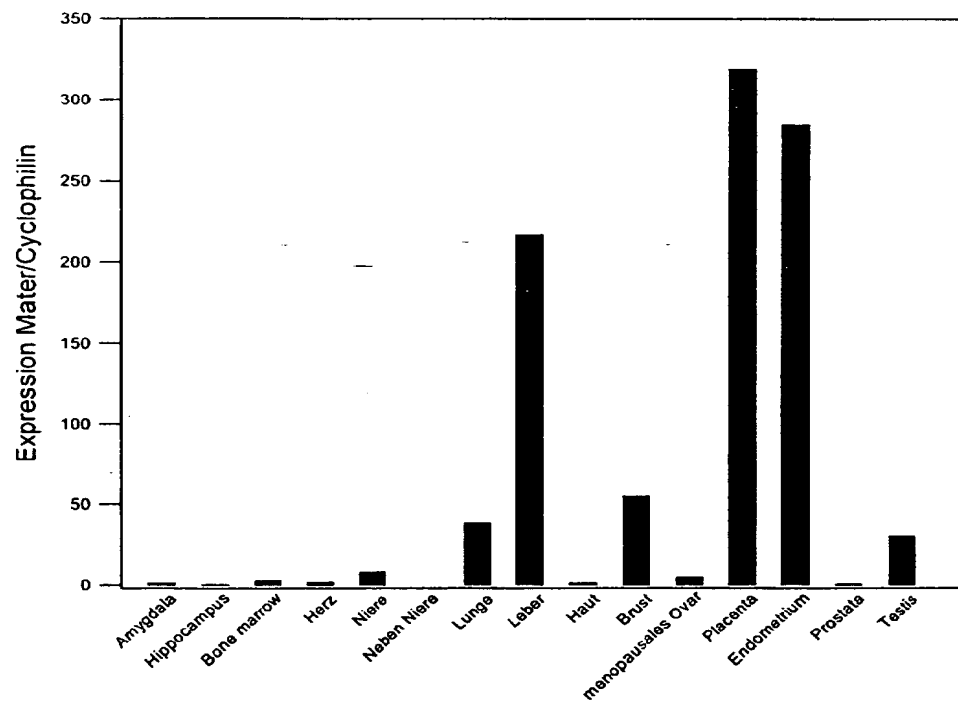
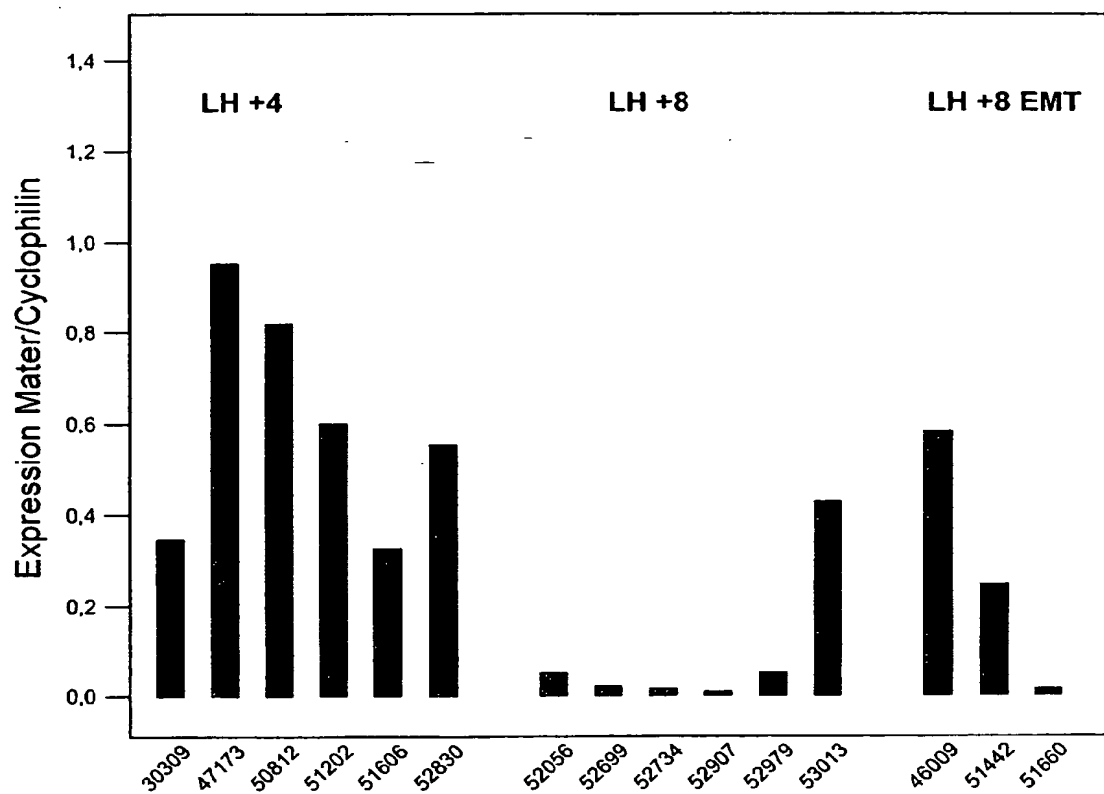


Fig: 4



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 285 964 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
05.03.2003 Patentblatt 2003/10

(51) Int Cl.7: **C12N 15/09**, C07K 14/47,
C07K 16/18, C12Q 1/68,
C12N 15/11, G01N 33/50

(43) Veröffentlichungstag A2:
26.02.2003 Patentblatt 2003/09

(21) Anmeldenummer: **02090246.6**

(22) Anmeldetag: **12.07.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **10.08.2001 DE 10139874**

(71) Anmelder: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
13353 Berlin (DE)**

(72) Erfinder:
• **Weiss, Bertram**
14163 Berlin (DE)
• **Lessl, Monika**
16548 Gienicke-Nordbahn (DE)
• **Peters-Kottig, Michael**
10437 Berlin (DE)
• **Beckmann, Georg**
10439 Berlin (DE)

(54) **Humane Mater Proteine**

(57) Es werden zwei humane MATER-Proteine sowie deren Verwendung für Fertilitätsstörungen, Therapie und Diagnose beschrieben.

EP 1 285 964 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 02 09 0246

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
P,X	WO 02 40668 A (APOTECH RES & DEV LTD ;TSCHOPP JUERG (CH); MARTINON FABIO (IT)) 23. Mai 2002 (2002-05-23) * Seite 10, Zeile 29 - Seite 14, Zeile 27 * Seite 14, Zeile 28 - Seite 19, Zeile 3 *	5-7	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 C12N15/11 G01N33/50
P,X	WO 02 32955 A (NELSON LAWRENCE M ;TONG ZHI BIN (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STA) 25. April 2002 (2002-04-25) * Seite 44, Zeile 4 - Zeile 6 * * Seite 44, Zeile 14 - Zeile 15 * * Seite 44, Zeile 30 - Zeile 34 * * Seite 48, Zeile 6 - Zeile 9 * * Seite 48, Zeile 29 - Zeile 37 * * Seite 51, Zeile 16 - Zeile 19 * --- -/-	5,13-16, 21,22	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			C12N C07K C12Q G01N
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenamt MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 16. Dezember 2002	
		Prüfer Voigt, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur	
		&: Mitglied der gleichen Patentfamilie: übereinstimmendes Dokument	

EP-C-Form 4: 5/03 03 32 (P/24/200)



Europäisches
Patentamt

UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT C

Nummer der Anmeldung

EP 02 09 0246

Obwohl die Ansprüche 25 und 26 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Vollständig recherchierte Ansprüche:
1-24

Nicht recherchierte Ansprüche:
25, 26

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Die geltenden Verwendungs bzw. Methodenansprüche 25 und 26 beinhalten Produkte, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Modulator des erfindungsgemässen Polypeptids zu sein, bzw. ein Effektor. Die Patentanmeldung beschreibt keinen einzigen Modulator, bzw. Effektor. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 84 EPÜ geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, dass er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 02 09 0246

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
X	MELNER M H ET AL: "Editorial: autoimmune premature ovarian failure-endocrine aspects of a T cell disease" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, Bd. 140, Nr. 8, 1999, Seiten 3401-3403, XP002181744 ISSN: 0013-7227 * Seite 3402, Spalte 2, Zeile 2 - Zeile 5 *	1-13	
X	--- TONG ZHI-BIN ET AL: "A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, Bd. 140, Nr. 8, August 1999 (1999-08), Seiten 3720-3726, XP002181743 ISSN: 0013-7227 * Seite 3724, Spalte 2, Zeile 1 - Zeile 9 * * Seite 3726, Spalte 1, Zeile 4 - Zeile 8 *	1-13	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
A	--- TONG Z-B ET AL: "MATER ENCODES A METERNAL PROTEIN IN MICE WITH A LEUCINE-RICH REPEATDOMAIN HOMOLOGOUS TO PORCINE RIBONUCLEASE INHIBITOR" MAMMALIAN GENOME, NEW YORK, NY, US, Bd. 11, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 281-287, XP001035150 ISSN: 0938-8990 * das ganze Dokument * --- -/--	1-26	

EPO FORM 1503 03 82 (P04C12)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 02 09 0246

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr

16-12-2002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0240668 A	23-05-2002	DE 10059595 A1	12-09-2002
		AU 1826902 A	27-05-2002
		WO 0240668 A2	23-05-2002
WO 0232955 A	25-04-2002	AU 4985201 A	29-04-2002
		WO 0232955 A1	25-04-2002

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82